论著

文章编号:1000-5404(2005)08-0760-04

肝再生增强因子重组质粒对肝纤维化大鼠的实验治疗作用

李 青,张丽梅,刘殿武,贺宇彤,肖永红,何海艳 (河北医科大学公共卫生学院流行病学教研室,石家庄 050017)

提 要:目的 研究肝再生增强因子真核表达质粒对免疫性肝纤维化大鼠的治疗作用并探讨其分子机制。**方法** 制作猪血清诱导的免疫性肝纤维化大鼠模型,将成模大鼠随机分成模型组、秋水仙碱治疗组(Col)、ALR治疗1组(ALR_1)、ALR治疗2组(ALR_2),分别给予生理盐水、秋水仙碱、pcDNA3-ALR重组质粒治疗。用药4周后处死大鼠,留取血标本和组织标本,免疫组织化学测定Ⅰ、Ⅲ型胶原、TIMP-1和ALR在肝组织的表达,RT-PCR测定TIMP-1 mRNA的表达。**结果** 两个ALR治疗组的肝纤维化分级明显改善。免疫组化结果显示,Ⅰ、Ⅲ型胶原和TIMP-1在肝组织的表达在两个ALR治疗组明显低于模型组,而ALR的表达要明显强于模型组。TIMP-1 mRNA在两个ALR治疗组肝组织中的表达明显低于模型组。**结论** ALR重组质粒对免疫性肝纤维化大鼠有改善作用,并可能通过抑制TIMP-1活性表达而促进肝细胞外基质降解。

关键词:肝纤维化;大鼠;肝再生增强因子;基因治疗;基质金属蛋白酶组织抑制因子-1

中图法分类号:R394.8; R459.9; R575.305 **文献标识码**:A

Therapeutic effects of augmenter of liver regeneration recombinant plasmid on rats with hepatic fibrosis

LI Qing, ZHANG Li-mei, LIU Dian-wu, HE Yu-tong, XIAO Yong-hong, HE Hai-yan (Department of Epidemiology, The School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To study the effects of eukaryotic expression plasmid of augmenter of liver regeneration (ALR) on rats with immune hepatic fibrosis and to explore their molecular mechanisms. **Methods** Ten of 50 Wistar rats was used as normal control and 40 were established as hepatic fibrosis models by administration of porcine serum intraperitoneally twice a week for 8 weeks. The model rats were randomized into 4 groups: model group, colchicine group (Col), ALR with simultaneous porcine serum injection (ALR_1) group, ALR without simultaneous porcine serum injection (ALR_2) group. Saline of 0.5 ml was given in control group once a day, colchicine of 0.14 mg/ml was given in Col group once a day. ALR recombinant plasmid of 200 μg/kg was injected through caudal vein in ALR_1 and ALR_2 once a week. Four weeks later, fifty rats were all sacrificed and the blood sample and liver tissue were dectected. Serum indicators were detected and histopathological changes were graded. Expression of type Ⅰ, Ⅲ collagen, TIMP-1 and ALR were detected by immunohistochemistry and expression of TIMP-1 mRNA was detected by RT-PCR. **Results** The hepatic fibrosis in ALR_1 and ALR_2 groups was improved as compared with model group. The level of type Ⅰ, Ⅲ collagen and TIMP-1 by immunohistochemistry in ALR_1 and ALR_2 groups were significantly lower than that in model group. But ALR expression was more visible in ALR_1 and ALR_2 groups. The expression level of TIMP-1 mRNA in the liver tissues of ALR_1 and ALR_2 groups was markedly decreased as compared with that in model group and the ALR level in ALR_2 group was also markedly decreased as compared with Col group and ALR_1 group. **Conclusion** ALR recombinant plasmid can ameliorate the hepatic fibrosis of rats through the depression of TIMP-1 expression and promotion of the catabolism of hepatic ECM.

Key words: hepatic fibrosis; rat; Augmenter of liver regeneration; gene therapy; tissue inhibitor of metalloproteinases-1

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(302489)

Supported by the National Natural Science Foundation of Hebei Province (302489)

作者简介:李 青(1965-),男,河北省藁城市人,博士研究生,副主任医师,主要从事肝纤维化的基因治疗方面的研究,发表论文9篇。电话:(0311)7887103,E-mail:lq65@yahoo.com.cn

通讯作者:刘殿武,电话:(0311)6265531,E-mail:liudianw@hebmu.edu.cn

收稿日期:2004-09-02;**修回日期**:2005-01-24

防治肝纤维化的发生和发展，对于改善慢性肝病的预后具有重要意义。目前认为肝纤维化进程是可以控制的，甚至是可以逆转的[1]。但时至今日，对于慢性肝炎、肝纤维化的治疗尚缺乏有效的措施。近年来，随着对肝纤维化的形成机制认识的深入及基因治疗技术的发展，采用基因调节治疗，已成为肝纤维化治疗的主要策略[2]。

肝再生增强因子（augmenter of liver regeneration，ALR）最早由 Hagiya 等[3]于 1994 年从新生大鼠肝组织中克隆，是目前已知惟一具备肝特异性的促肝细胞增殖因子，对肝再生具有强力促进作用。我们通过实验研究，观察 ALR 重组质粒对免疫性肝纤维化大鼠的治疗作用并分析其作用机制。

1　材料与方法

1.1　构建 ALR 重组质粒

方法参照文献[4]。

1.2　动物实验

健康雄性 3 周龄 Wistar 大鼠 50 只，体质量 120～150 g（河北医科大学实验动物中心提供），常规喂养。分别称体质量，根据体质量顺序编号，单纯随机抽样方法取 10 只为正常组（N），给生理盐水腹腔注射，余 40 只参照黄志刚等[5]方法给予猪血清腹腔内注射制作免疫性肝纤维化模型，0.5 ml/只，2 次/周，至第 8 周随机处死 2 只大鼠经肝组织病理学检查证实肝纤维化形成。

将成模大鼠重新称体质量，顺序编号，采用 SPSS 11.5 统计软件 Random Number Seed 程序，随机分为 4 组：模型组（M）9 只，每只给蒸馏水 0.5 ml 灌胃，1 次/d；治疗对照组，秋水仙碱（colchicine，Col），10 只，0.14 mg/kg 灌胃，1 次/d；另两个组用 ALR 治疗，用量为：pcDNA3-ALR 重组质粒 200 μg/kg，每周 1 次尾静脉注射。其中，ALR 中的 1 个组（ALR_1 组，9 只）在治疗的同时继续猪血清腹腔注射，而另 1 组（ALR_2 组，10 只）则停止猪血清腹腔注射。根据文献[6～8]，pcDNA3 空质粒对免疫性肝纤维化大鼠无治疗作用，故未用 pcDNA3 做治疗对照。

治疗 4 周后股动脉放血处死大鼠，取血标本和肝组织等组织标本备检。

1.3　检测指标

1.3.1　组织病理学　　常规 HE 染色和 Masson 胶原纤维特殊染色。肝纤维化病理学分级参照 2000 年修订的病毒性肝炎防治方案分为 S 0～4 级。

1.3.2　血清学指标　　肝细胞酶学指标（ALT、AST）由石家庄市中医院检验科测定；肝纤 4 项（HA、LN、PCⅢ和Ⅳ型胶原）的检测方法按说明操作（放免法）。

1.3.3　肝脏羟脯氨酸（hydroxyproline，Hyp）测定　　试剂购自南京建成生物工程研究所，方法参照文献[9]。

1.3.4　免疫组化检测　　Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、基质金属蛋白酶组织抑制因子-1（tissue inhibitor of metalloproteinase-1，TIMP-1）和 ALR 在肝组织中的表达。

检测 ALR 表达的一抗为重组人 ALR 单克隆抗体（华北制药集团新药开发公司）。方法参照文献[10]。Image-Pro Plus 型多功能真彩色细胞图像分析管理系统做图像分析。

1.3.5　RT-PCR 定量检测 TIMP-1 mRNA 表达　　TIMP-1（482 bp）上游引物：5′-TTCGTGGGGACACCAGAAGTC-3′，下游引物：5′-TATCTGGGACCGCAGGGACTG-3′。β-actin（234 bp）上游引物：5′-GGAGAAGATGACCCAGATCA-3′，下游引物：5′-GATCTTCATGAGGTAGTCAG-3′。

用 Promega 公司的试剂盒提取肝组织总 RNA，RT-PCR 扩增，2% 的琼脂糖凝胶电泳，Alpha Imager 2000 图像处理仪定量分析。用 TIMP-1/β-actin 比值表示 TIMP-1 表达水平。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据分析，计数资料的比较采用秩和检验；计量资料用单因素方差分析，两两比较用 q 检验（LSD 法）。

2　结果

2.1　ALR 对肝脏病理变化及肝纤维化程度的影响

正常组大鼠肝组织纤维化分级全部为 0 级，模型组大鼠为 3～4 级，ALR 和 Col 治疗组大鼠肝组织纤维化分级多为 1～3 级。统计结果显示，Col 治疗组和两个 ALR 治疗组大鼠的肝纤维化程度均明显改善，3 个组与模型组相比均有显著性差异（$P<0.05$），但 3 个治疗组之间肝纤维化分级无明显差异（$P>0.05$）。

2.2　ALR 对大鼠肝纤维化血清学指标的影响

ALR 对第 1 组和第 2 组的肝纤维化指标都有明显的改善作用；而且对Ⅲ型前胶原的影响，ALR 优于 Col，ALR 对第 2 组的效果优于对第 1 组。结果见表 1。

表 1　ALR 对大鼠肝纤维化指标的影响（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Effects of ALR on the serum content of HA，LN，PCⅢ and Ⅳ collagen（$\bar{x} \pm s$）

Group	n	HA（ng/ml）	LN（ng/ml）	PCⅢ（ng/ml）	Ⅳ collagen（ng/ml）
N	10	338.99±48.26	33.27±11.50	10.14±2.78	36.81±13.60
M	9	436.00±40.25	62.56±9.76	19.56±6.84	125.11±45.47
Col	10	357.90±90.98*	41.00±13.74**	11.30±4.45**	37.70±8.91**
ALR_1	9	327.43±111.26**	36.56±10.03**	12.61±8.76*	41.28±23.87**
ALR_2	10	319.30±74.11**	36.00±8.79**	5.72±2.14**◆▼	38.35±16.34**
F		3.401	10.672	7.967	22.848
P		0.017	0.0001	0.0001	0.0001

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* M；◆：$P<0.05$，*vs* Col；▼：$P<0.01$，*vs* ALR_1

2.3　ALR 对大鼠肝功能的影响

ALR 对肝细胞酶学指标（ALT、AST）均有改善作用，结果与模型组相比有显著性差异（$P<0.05$）；改善效果与 Col 相似，结果与 Col 组相比无明显差异（$P>0.05$）。表明 ALR 对损伤的肝细胞有保护和促进恢复的作用。

2.4　肝组织匀浆 Hyp 的检测结果

ALR 能明显降低肝纤维化大鼠肝组织胶原含量，并且 ALR 对第 2 组的改善效果明显优于对第 1 组和秋水仙碱组

($P<0.05$)。

2.5 免疫组化结果

图像分析显示模型组Ⅰ、Ⅲ型胶原、TIMP-1的阳性密度值最高,各治疗组的密度明显降低。且ALR对第2组(ALR_2)TIMP-1表达的影响效果明显优于第1组(ALR_1)和秋水仙碱组。结果见表2、图1。ALR在正常组肝组织没有表达,模型组有表达,在ALR两个治疗组的表达明显增强。结果见表2、图2。

表2 免疫组化及RT-PCR结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of ALR on Ⅰ, Ⅲ collagen and TIMP-1 mRNA levels ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Ⅰ collagen	Ⅲ collagen	TIMP-1	ALR	TIMP-1 mRNA/β-actin
N	10	3.23±0.98	2.92±1.04	0.16±0.05	0.109±0.018	0.49±0.08
M	9	10.83±3.58	10.25±2.61	0.53±0.12	0.159±0.018	1.36±0.11
Col	10	7.10±1.76**	5.81±1.86**	0.30±0.05**	0.156±0.021	0.77±0.16**
ALR_1	9	6.94±1.42**	7.18±1.95**	0.39±0.05**◆	0.197±0.035*◆	0.89±0.08**◆
ALR_2	10	5.80±1.66**	4.50±1.67**▼	0.20±0.05**◆▼	0.198±0.022*◆	0.65±0.11**★▼
F		16.978	20.934	38.765	12.999	79.021
P		0.000 1	0.000 1	0.000 1	0.000 1	0.000 1

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* M; ★: $P<0.05$; ◆: $P<0.01$, *vs* Col; ▼: $P<0.01$, *vs* ALR_1

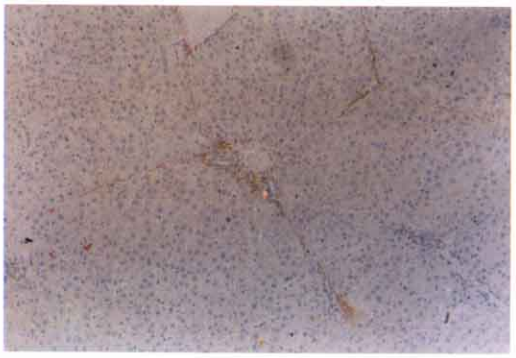


图1 ALR_2组大鼠肝组织TIMP-1免疫组织化学结果 (S-P×200)

Fig 1 Immunohistochemical results of TIMP-1 expressed in rat liver tissue of ALR_2 group (S-P×200)

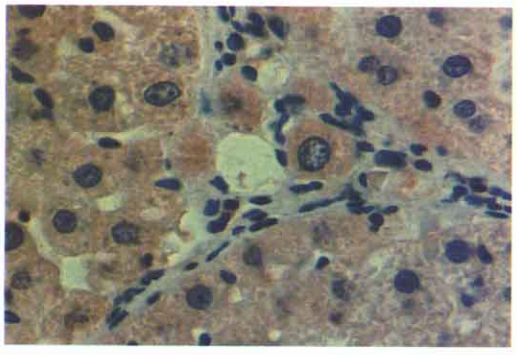
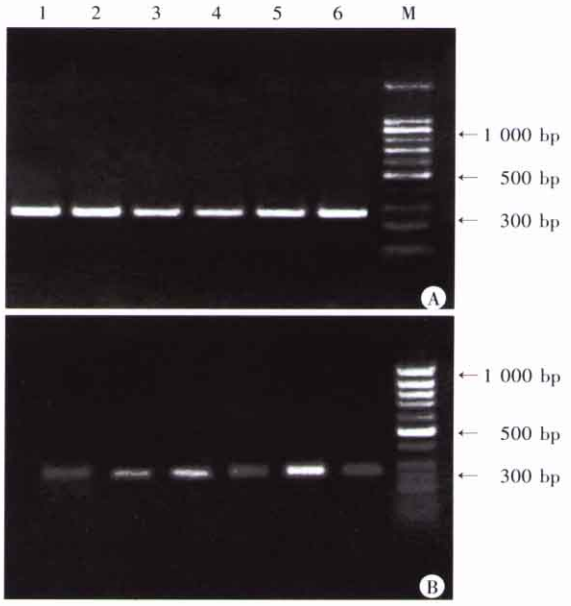


图2 ALR_2组大鼠肝组织ALR免疫组织化学结果 (S-P×400)

Fig 2 Immunohistochemical results of ALR expressed in rat liver tissue of ALR_2 group (S-P×400)

2.6 TIMP-1 mRNA表达结果

以模型组为最高,各治疗组表达均明显下降,尤以ALR_2组最明显。并且ALR对第2组(ALR_2)的效果明显优于对第1组(ALR_1)和秋水仙碱组。结果见表2、图3。



A: Expression of β-actin mRNA in different groups by RT-PCR; B: Expression of TIMP-1 mRNA in different groups by RT-PCR; 1: ALR_2; 2: ALR_1; 3: Col_2; 4: Col_1; 5: Model; 6: Control; M: Marker

图3 TIMP-1 mRNA在各组的表达

Fig 3 Expression of TIMP-1 mRNA in different groups

3 讨论

本实验在大鼠肝纤维化模型制作成功后,ALR干预组分成两组:一组停止致病因素;另一组继续致病因素(腹腔注射猪血清)。我们认为,后者更接近人类慢性肝炎、肝纤维化的自然病理生理过程,因为致病因素(HBV的复制)并不随治疗的开始而终止。

实验结果显示,ALR可降低模型大鼠的ALT、AST,减轻肝细胞的损伤,促进损伤肝细胞的恢复;可抑制Ⅰ、Ⅲ型胶原和TIMP-1在肝组织中的表达,且整体效果优于秋水仙碱,证明ALR对大鼠肝纤维化有控制和改善作用。几项指标综合评价,ALR对第2组的改善效果优于第1组(继续腹腔注射猪血清),提示在防治肝纤维化的同时要注意针对病因的治疗,消除致病刺激因素,才能达到理想的治疗效果,控制病情的发展。

肝纤维化的主要病理变化是肝细胞外基质(extarcellular matrix, ECM)在肝脏中过度沉积。ECM主要由肝星状细胞等产生,由基质金属蛋白酶(matrix

metalloproteinase, MMPs)降解，在正常情况下，生成与降解处于一个动态平衡中。而 TIMP-1 能抑制所有已发现的 MMPs 的活性，在 ECM 的生成与降解平衡中起重要作用。

研究表明，肝纤维化过程中 TIMP-1 表达增加是胶原降解减少的主要原因，可促进肝纤维化的进展。TIMP-1 在受损的肝脏中，尤其是在肝纤维化、肝硬化时，表达水平明显提高，且出现时间较早，幅度较大，因而被认为是肝纤维化、肝硬化形成的启动因子[1,11]。这给抗纤维化战略的确立提供了一个重要的信号，抑制 TIMP-1 mRNA 的表达也许是肝纤维化逆转的基本机制和治疗肝纤维化的主要策略。

在正常肝组织，Ⅰ、Ⅲ型胶原占全部胶原含量的 80%，而在纤维化肝组织则升至 95%，其中Ⅰ型占 60%～70%，Ⅲ型为 20%～30%。因此，Ⅰ、Ⅲ型胶原被认为是反映胶原代谢的重要参数以及判定抗纤疗效的重要指标[12]。通过免疫组化测定显示，与模型组相比，两个 ALR 治疗组Ⅰ、Ⅲ型胶原的含量明显降低。同时发现，TIMP-1 和 TIMP-1 mRNA 在模型组的表达明显增强，而在两个 ALR 治疗组则明显降低。

Ueki 等[13]利用肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)基因治疗大鼠实验性肝纤维化取得成功。HGF 对肝细胞具有非特异性促增殖作用，提示具有特异性促肝细胞增殖作用的 ALR 可能也有抗肝纤维化作用。已有学者研究发现，ALR 对肝纤维化有一定的逆转和保护作用[14,15]。另有学者认为，ALR 可抑制肝星状细胞株的增殖及 ECM 的合成，可能参与了 ALR 抗肝纤维化的作用机制[16]。

我们的研究发现，异种蛋白导致的免疫性肝纤维化大鼠肝组织胶原含量明显增加，TIMP-1 mRNA 的表达也明显高于正常大鼠。而 ALR 重组质粒可减低实验性肝纤维化大鼠肝组织的胶原含量，抑制 TIMP-1 mRNA 在肝组织的高表达，这也许是 ALR 重组质粒控制及改善肝损伤，逆转免疫性肝纤维化的作用机制之一。

参考文献：

[1] Benyon R C, Iredale J P. Is liver fibrosis reversible[J]? Gut, 2000, 46(4): 443－446.

[2] Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, *et al*. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(5): 2345－2349.

[3] Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, *et al*. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(17): 8142－8146.

[4] 张丽梅，刘殿武，杨　洁，等. 大鼠肝再生增强因子真核表达质粒的构建及其抗急性肝功能衰竭作用的研究[J]. 河北医科大学学报，2004，25(2)：68－70.

[5] 黄志刚，翟为溶，张月娥，等. 异种动物血清诱导的大鼠肝纤维化模型及其机制[J]. 上海医科大学学报，1997，24(5)：351－354.

[6] 蒋　炜，王吉耀，杨长青，等. 反义金属蛋白酶组织抑制因子-1 表达质粒对实验性肝纤维化的影响[J]. 肝脏，2003，8(3)：4－8.

[7] 蒋　炜，王吉耀，杨长青，等. 反义转化生长因子βⅠ型受体表达质粒对实验性肝纤维化的影响[J]. 中华医学杂志，2002，82(17)：1160－1164.

[8] 蒋　炜，王吉耀，杨长青，等. 反义转化生长因子βⅡ型受体表达质粒对实验性肝纤维化的影响[J]. 中华肝脏病杂志，2004，12(3)：137－140.

[9] 许　青，刘彦君，李　石，等. 维生素 A 对实验性大鼠肝纤维化的影响[J]. 第二军医大学学报，1996，17(5)：431－433.

[10] 朱　冰，刘殿武，房文亮，等. 抗纤Ⅰ号对实验性肝纤维化大鼠组织Ⅰ、Ⅲ型胶原及转移生长因子 β1mRNA 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志，2003，9(1)：21－23.

[11] Arthur M J, Fibrogenesis I I. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279(2): G245－G249.

[12] Liu W B, Yang C Q, Jiang W, *et al*. Inhibition on the production of collagen type Ⅰ, Ⅲ of activated hepatic stellate cells by antisense TIMP-1 recombinant plasmid[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(2): 316－319.

[13] Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, *et al*. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver fibrosis in rats[J]. Nat Med, 1999, 5(2): 226－230.

[14] Tanigawa K, Sakaida I, Masuhara M. Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer(NK) cell activity in human liver disease[J]. J Gastroenterol, 2000, 35(2): 112－119.

[15] 邱德凯，沈　敏，熊伍军，等. 重组肝再生增强因子对大鼠肝纤维化的保护作用[J]. 肝脏，2002，7(1)：14－16.

[16] 曹芝君，邱德凯，沈　敏，等. 重组肝再生增强因子、苦参素和丹参对肝脏星形细胞株 IG12 的作用[J]. 上海第二医科大学学报，2002，22(6)：501－504.

(编辑　张大春)